

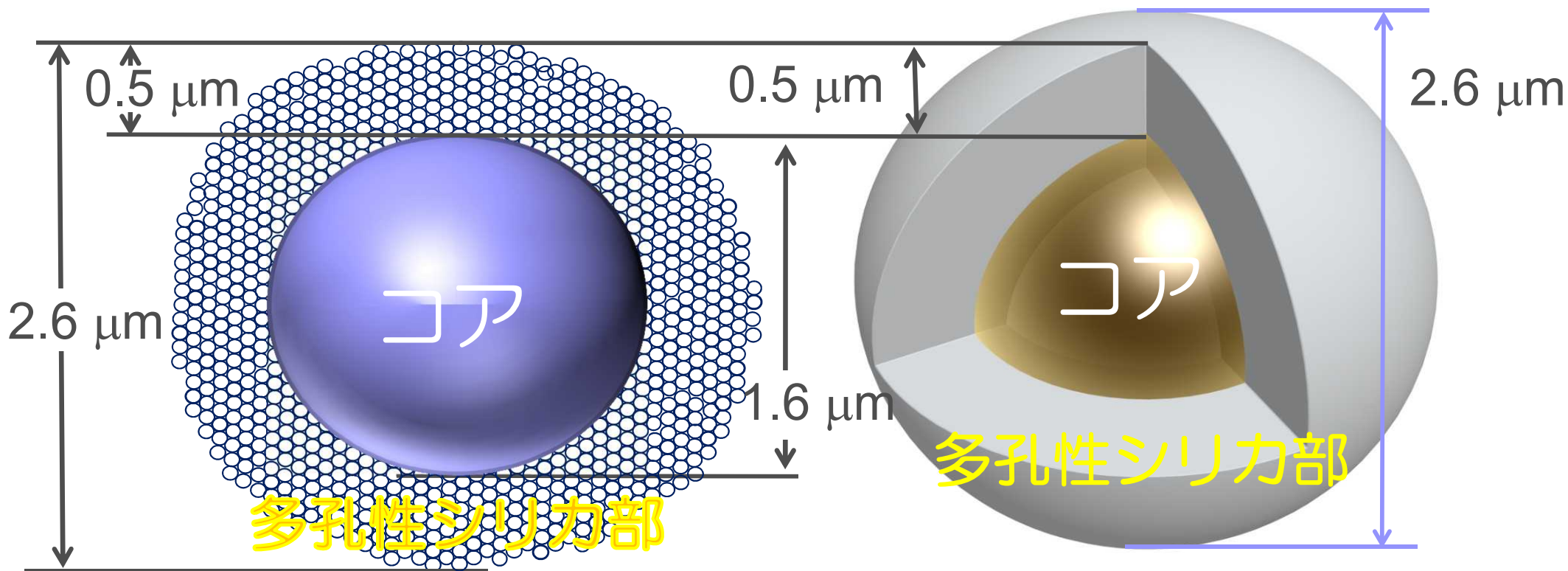
HPLC,UHPLCそれぞれの視点から見た コアシェル型充填カラムと全多孔性充填 カラムとの比較

○塚本 友康, 長江 徳和
(クロマニックテクノロジーズ)

表面多孔性シリカ（コアシェル）

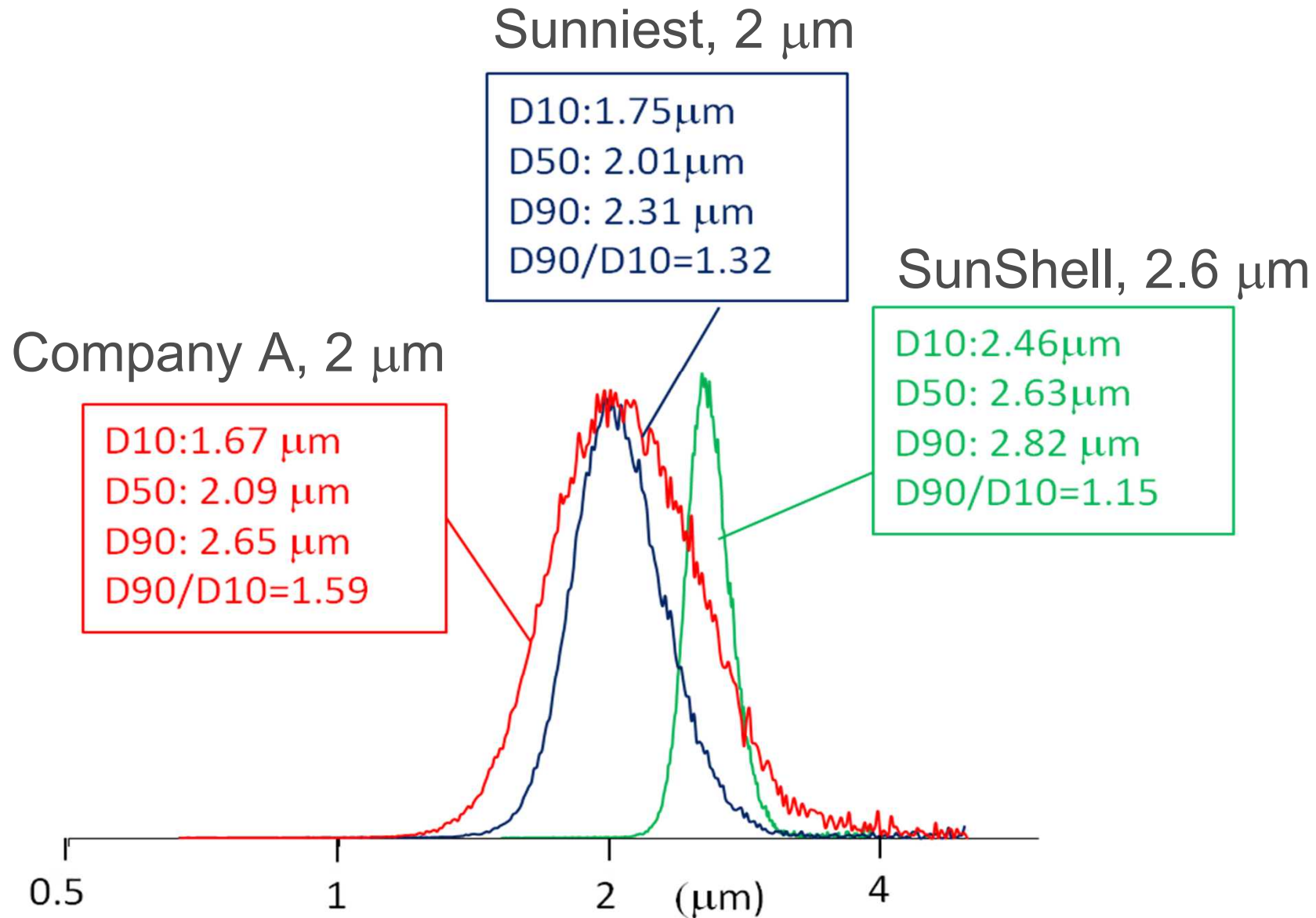
- 細孔のない核（コア）と多孔質層から形成されているシリカ粒子であり、全多孔性シリカ粒子に比べ表面積は小さい
- 粒子全体に対する多孔質層の割合が77%と高いため、試料負荷量が低くなる欠点を克服
- 粒子細孔径が9nmで低分子化合物の分離に適している
- 同じサイズの全多孔性粒子の1.5倍の理論段数を有している
- 全多孔性シリカより狭い粒径分布が得られる

SunShellシリカのコアシェル構造の概略図

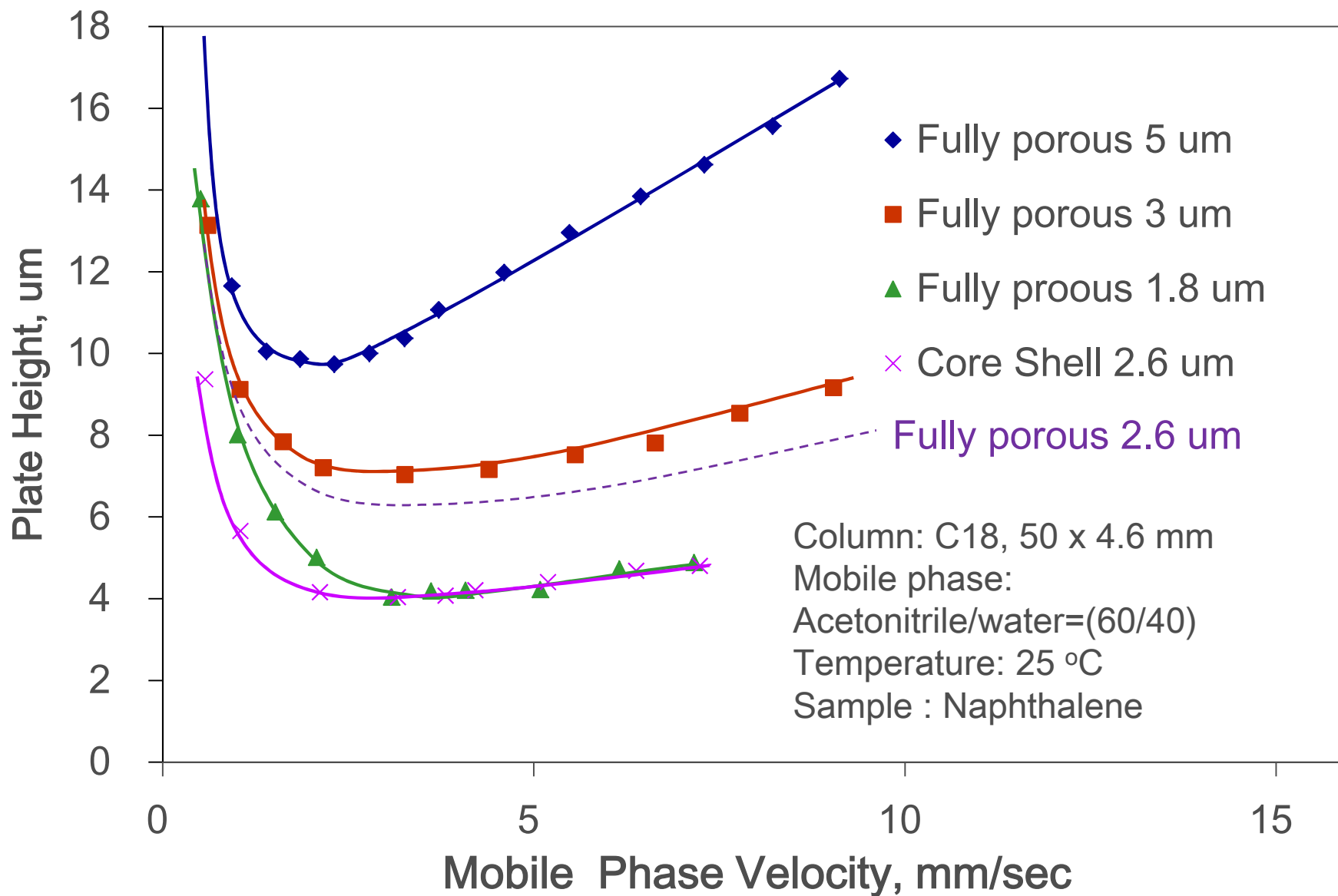


粒子径：2.6 μm ，コア径：1.6 μm ，多孔質層の厚さ：0.5 μm
 細孔容積：0.30 mL/g，比表面積：150 m^2/g ，細孔径：9 nm
 多孔性シリカの体積の割合：77%

粒度分布の比較



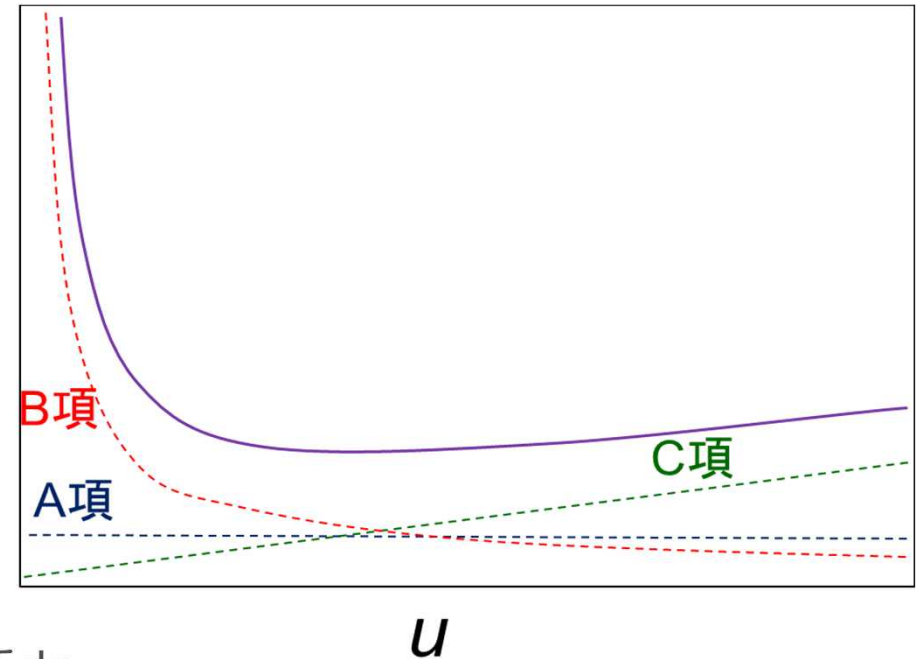
全多孔性とコアシェル型の理論段高さの比較



Van Deemterの式

$$H = A d_p + B \frac{D_m}{u} + C \frac{d_p^2}{D_m} u$$

H

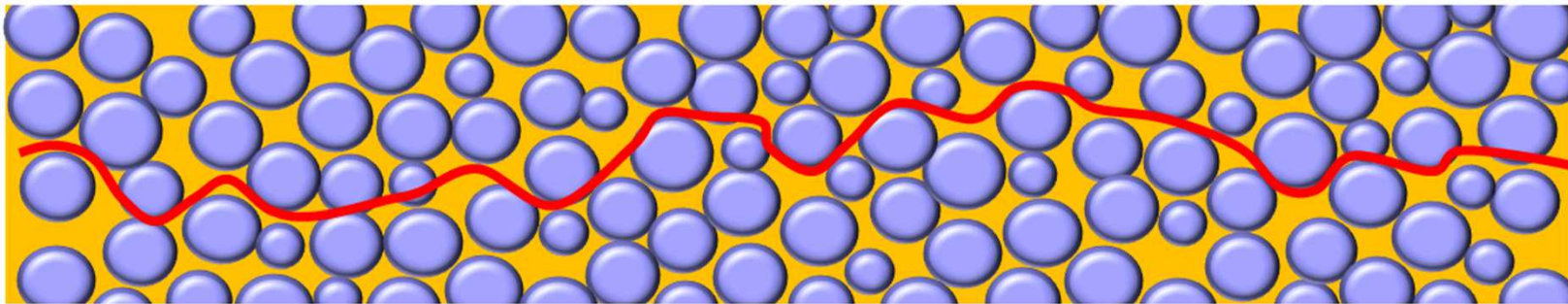


- A項 : 多流路拡散、渦巻き拡散 : 粒径を d_p
- B項 : カラム軸方向への拡散、アナライトの移動相中の拡散係数を D_m
- C項 : 物質移動の項 : 固定相-移動相での物質移動、粒子内での
拡散による物質移動に依存

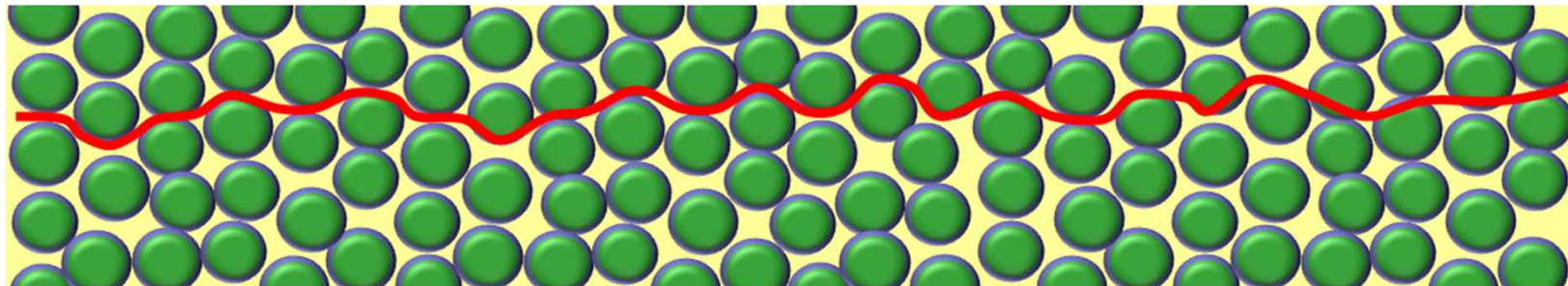
1. F. D. Antia and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 1-15.

A項が小さくなる

粒度分布の広い充填剤（一般的な全多孔性シリカ）



粒度分布の狭充填剤（コアシェルシリカ）

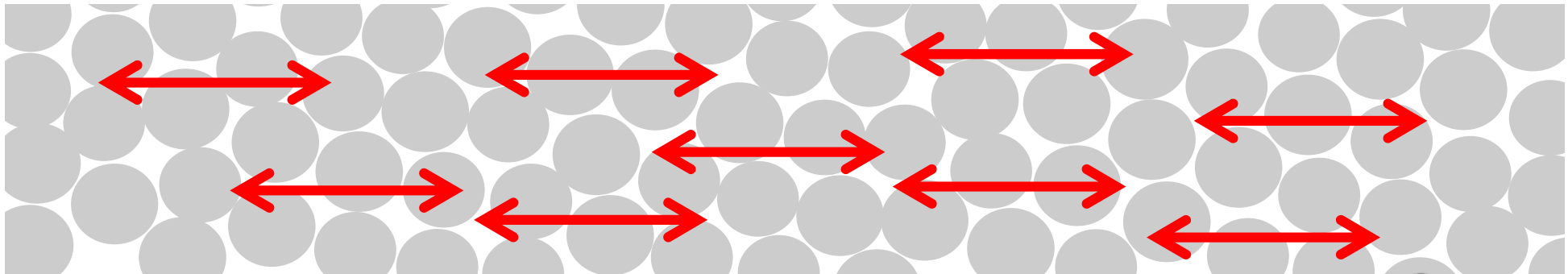


多流路拡散、渦巻き拡散が小さくなる → Ad_p のAが小さくなる

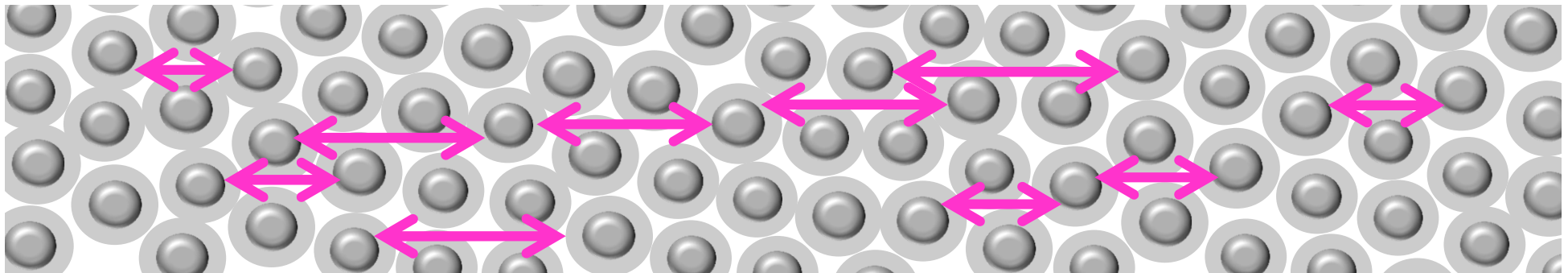
カラム軸方向への拡散の差

溶質は細孔内も粒子外と同様に拡散する

全多孔性充填剤



コアシェルシリカ

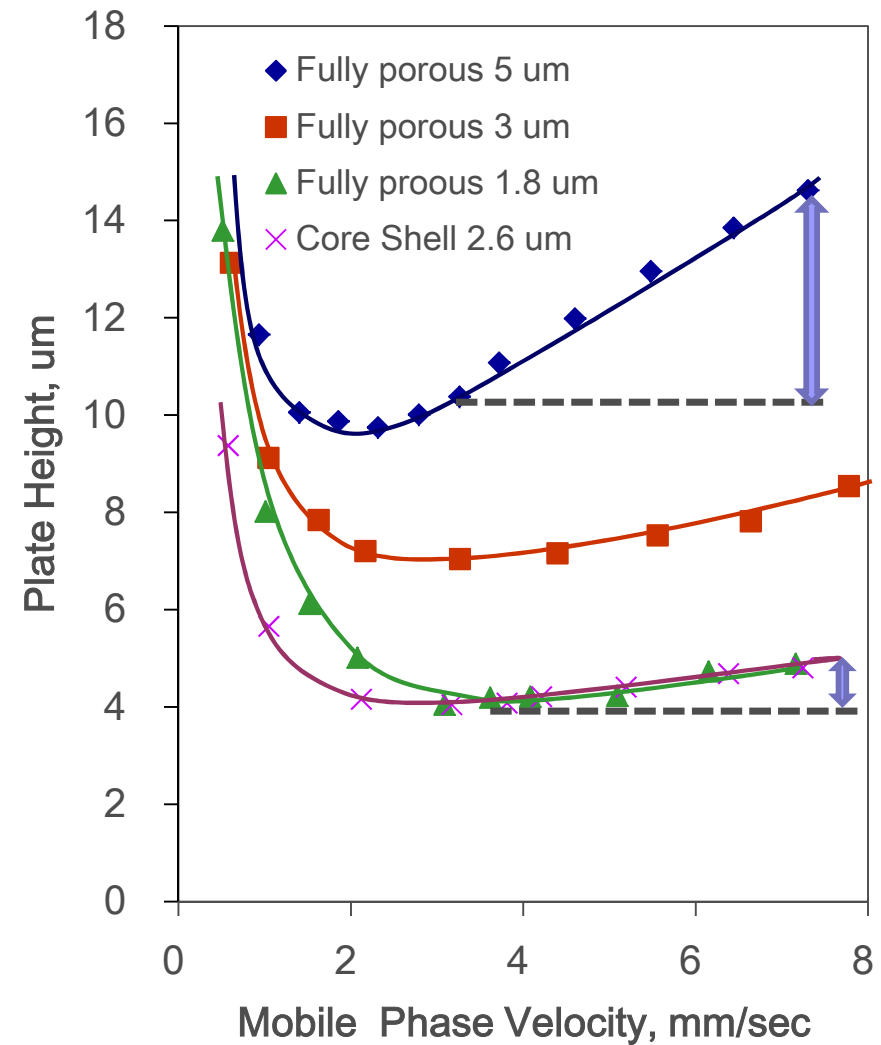
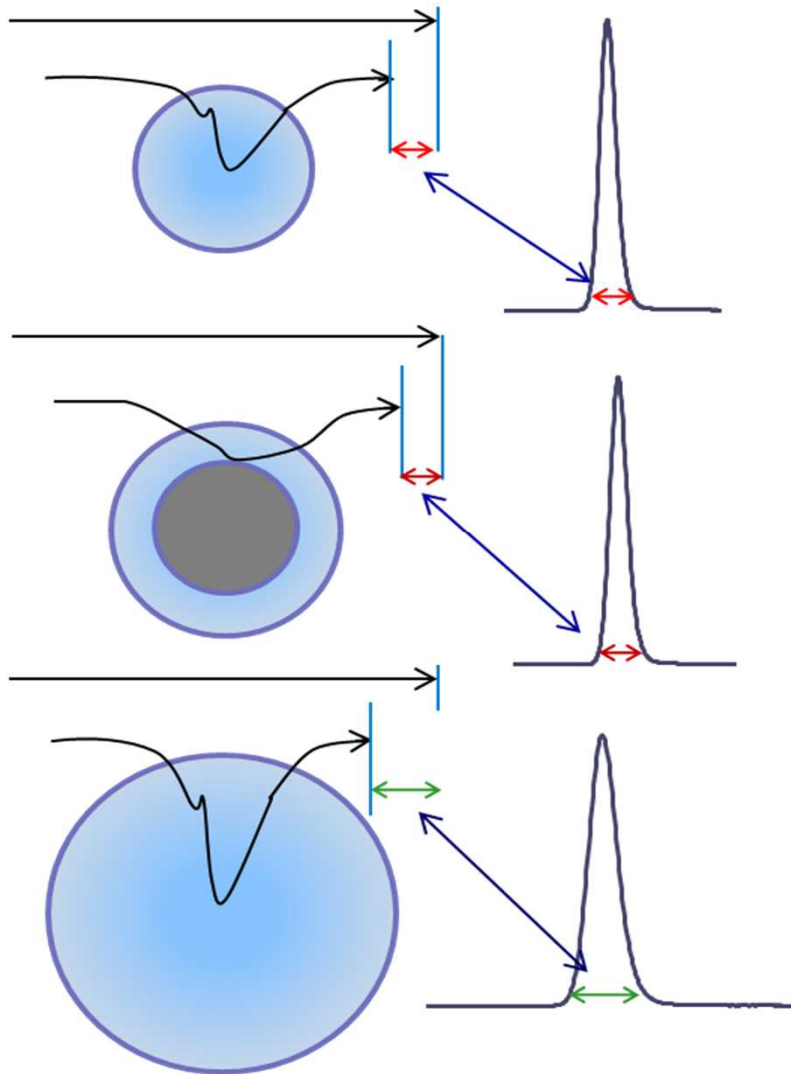


細孔のないコアの存在により、
カラム軸方向の拡散が阻害される



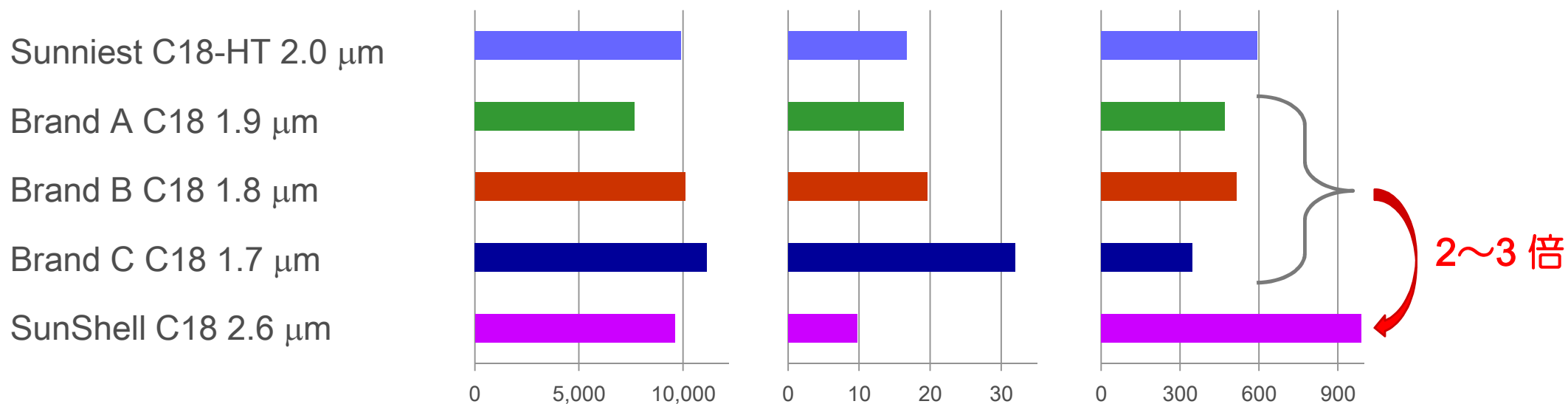
B項が小さくなる

『拡散による物質移動（の遅れ）』はC項に関係している



単位圧力あたりの段数比較

	Plates	Pressure(MPa)	Plates/pressure
Sunniest C18-HT 2.0 μm	9,900	16.7	593
Brand A C18 1.9 μm	7,660	16.3	470
Brand B C18 1.8 μm	10,100	19.6	515
Brand C C18 1.7 μm	11,140	32.0	348
SunShell C18 2.6 μm	9,600	9.7	990



2~3 倍

Column: 50 x 2.1 mm C18, Mobile phase: Acetonitrile/water=(70/30), Temperature: 25 °C

インピーダンスタイム t_0/N^2

カラム圧が一定の場合の t_0 （保持がないときの溶出時間）は N^2 （理論段数の2乗）に比例する

$$t_0 \propto N^2$$

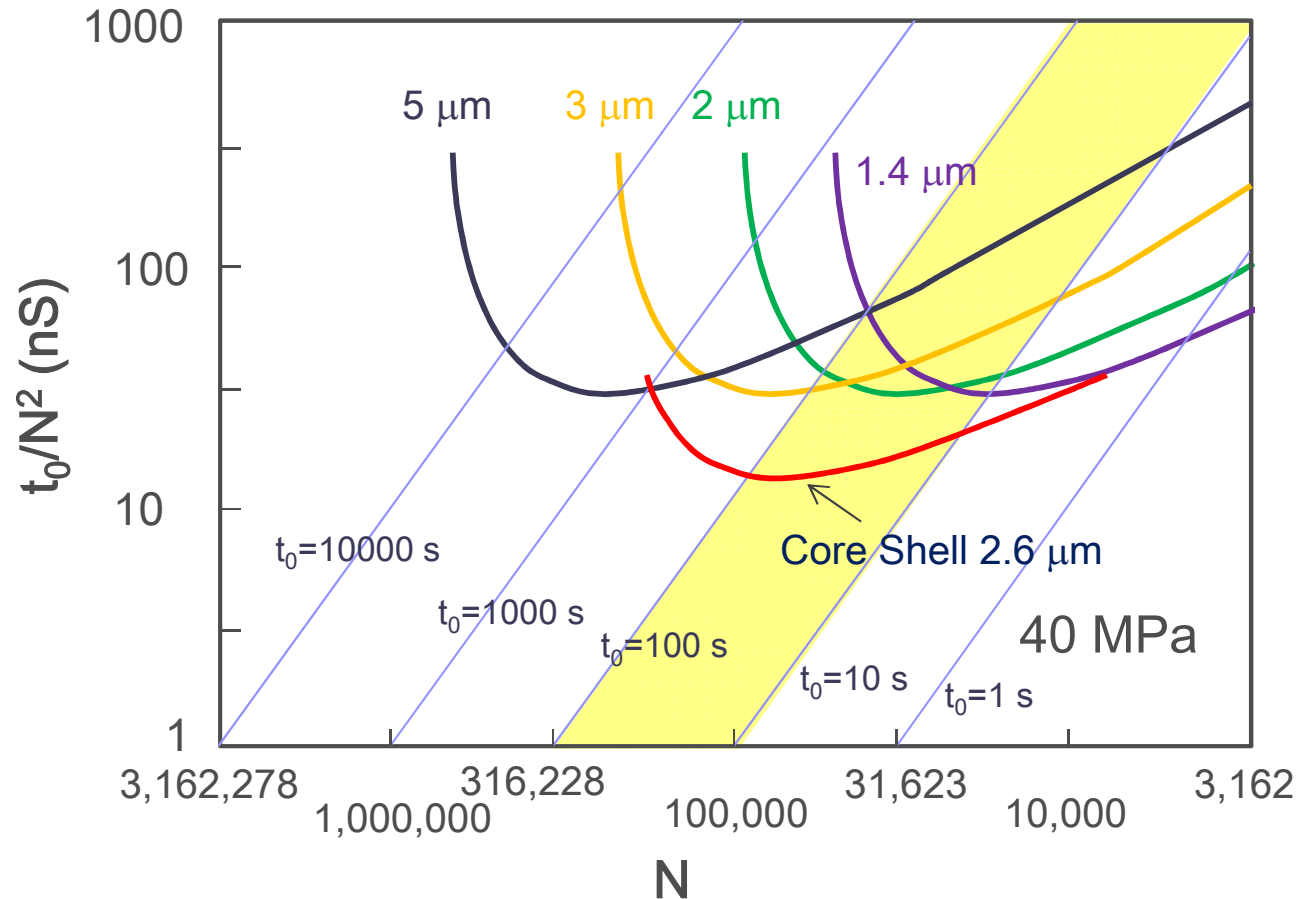
$$t_0 = A \cdot N^2 \quad A = t_0/N^2$$

理論段数	カラム長さ	カラム圧	流速	t_0
10,000	15 cm	10 MPa	1.0 mL/min	100 S
20,000	30 cm	20 MPa	1.0 mL/min	200 S
20,000	30 cm	10 MPa	0.5 mL/min	400 S

10 MPaの一定圧力条件で、理論段数(N)を2倍にするためにはカラム長さを2倍にし、流速を1/2にしなければならない。

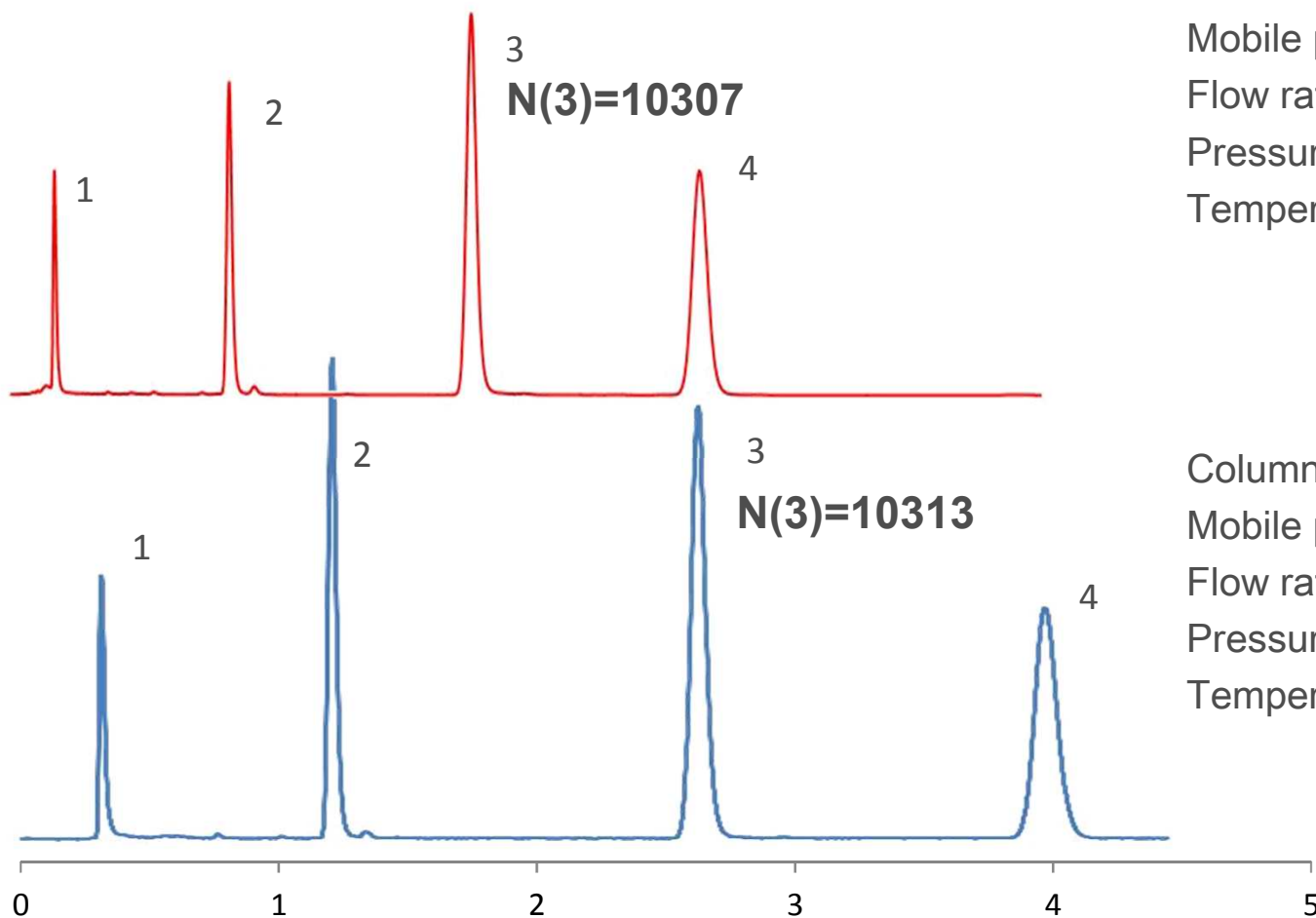
→ t_0 は4倍になる

コアシェル型充填剤と全多孔性充填剤の t_0/N^2 （インピーダンスタイム）と N （理論段数）との関係



評価条件：圧力40 MPa, flow resistance parameter $\Phi=700$, 移動相粘度 $\eta = 0.00046$ Pa s, 溶質の拡散係数 $D_m = 2.22 \times 10^{-9}$ m²/s, 粒子充填型カラムにおける Knox 式 $h = 0.65 \nu^{1/3} + 2/\nu + 0.08 \nu$, 粒子径 (dp) 1.4, 2, 3および5 μm

2 μm 全多孔性カラムとの比較



Column: Sunniest C18, 2 μm 50 x 2.1 mm
 Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=60/40$
 Flow rate: 0.6 mL/min
 Pressure: 28 MPa
 Temperature: 40°C

Column: SunShell C18, 2.6 μm 50 x 2.1 mm
 Mobile phase: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=60/40$
 Flow rate: 0.3 mL/min
 Pressure: 10 MPa
 Temperature: 25 °C

Sample: 1 = Uracil, 2 = Toluene, 3 = Acenaphthene, 4 = BUtylbenzene

塩基性化合物の分離の比較

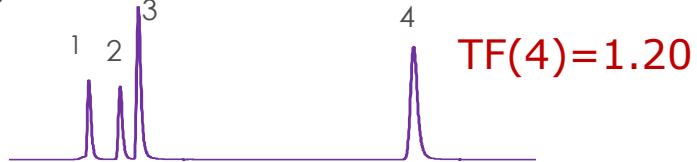
A Sunniest C18 (HMODTS), 5 μm



B Sunniest C18-HT(HMODTS), 2 μm



C SunShell C18(HMODTS), 2.6 μm core shell type



D Brand D C18, 2.6 μm core shell type



E Brand E C18, 5 μm



Column size: 150 x 4.6 mm for A, D and E

100 x 2.1 mm for B and C

Mobile phase:

CH₃CN/20mM Phosphate buffer pH7.0=60/40

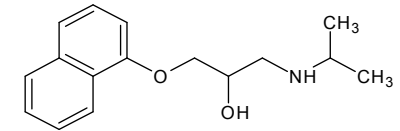
Flow rate: 1.0 mL/min for A, D, and E

0.4 mL/min for B and C

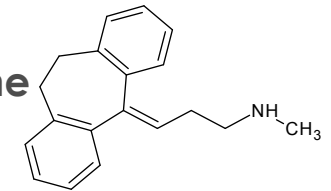
Temperature: 40 °C

Sample: 1 = Uracil

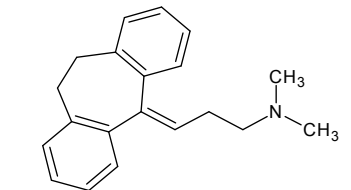
2 = Propranolol



3 = Nortriptyline



4 = Amitriptyline

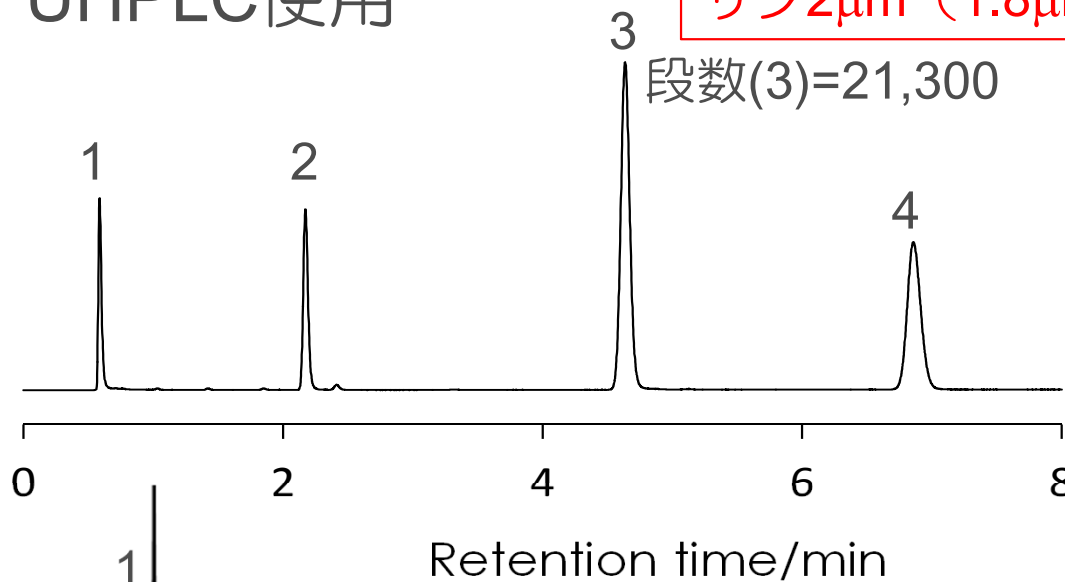


TF: USP tailing factor

コアシェルC18の標準試料の分離例

UHPLC使用

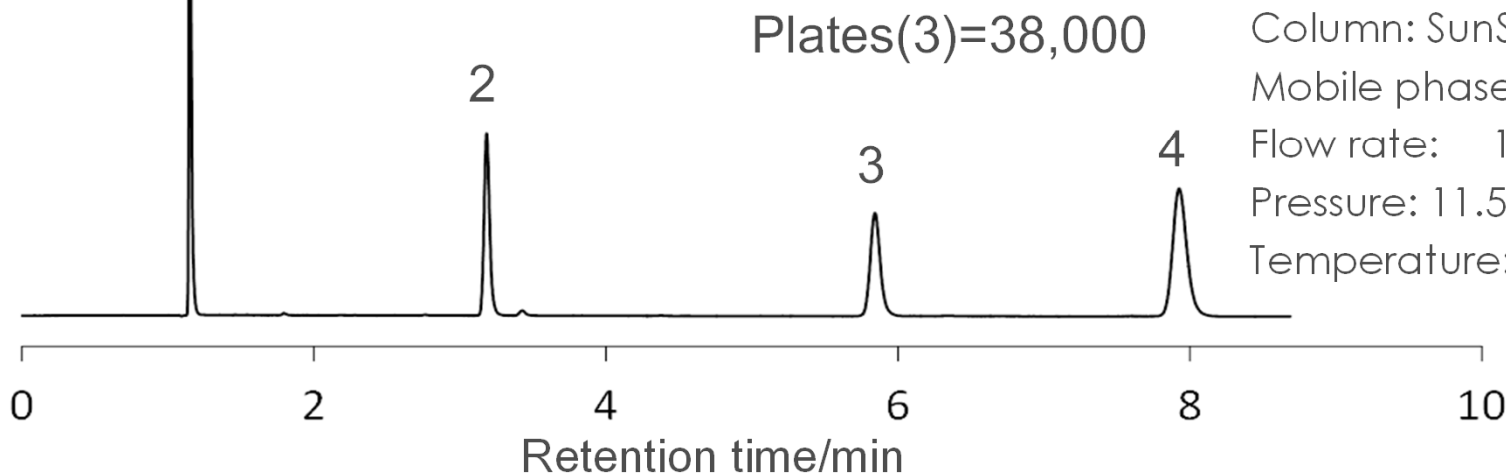
サブ2 μm (1.8 μm) と同じ段数



Column: SunShell C18, 2.6 μm 100 x 2.1 mm
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40
 Flow rate: 0.3 mL/min
 Pressure: 12.5 MPa
 Temperature: 25 °C

サブ2 μm (1.8 μm) の
 半分以下の圧力

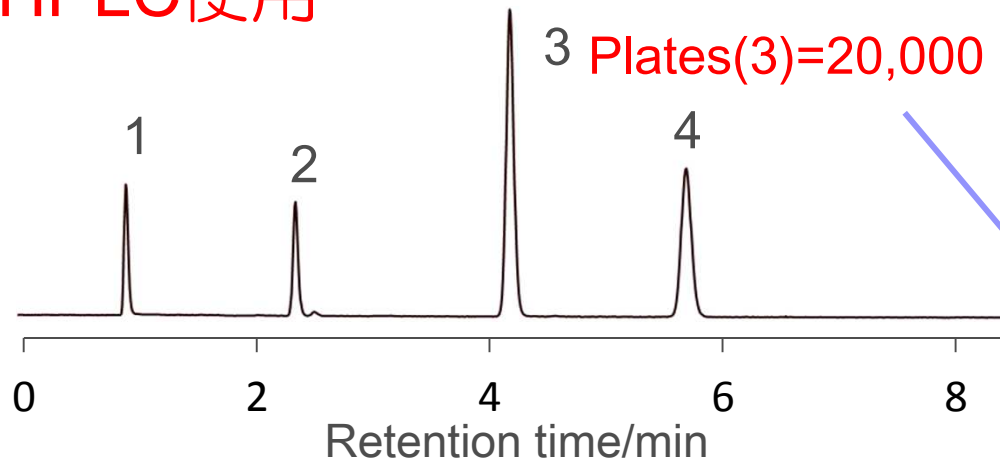
Sample: 1 = Uracil
 2 = Toluene
 3 = Acenaphthene
 4 = BUtylbenzene



Column: SunShell C18, 2.6 μm 150 x 4.6 mm
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O=70/30
 Flow rate: 1.0 mL/min
 Pressure: 11.5 MPa
 Temperature: 25 °C

HPLC使用時のコアシェルC18の標準試料の分離例

HPLC使用



Column: SunShell C18, 2.6 mm 100 x 4.6 mm
150 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/H₂O=70/30

Flow rate: 1.0 mL/min

Pressure: 9.5 MPa, 13.5 MPa

Temperature: 25 °C

Sample: 1 = Uracil

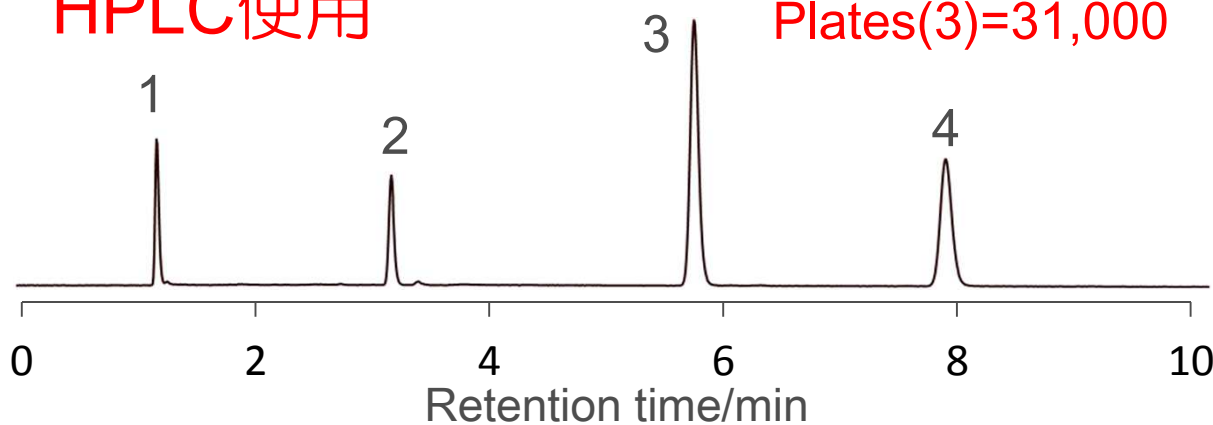
2 = Toluene

3 = Acenaphthene

4 = BUtylbenzene



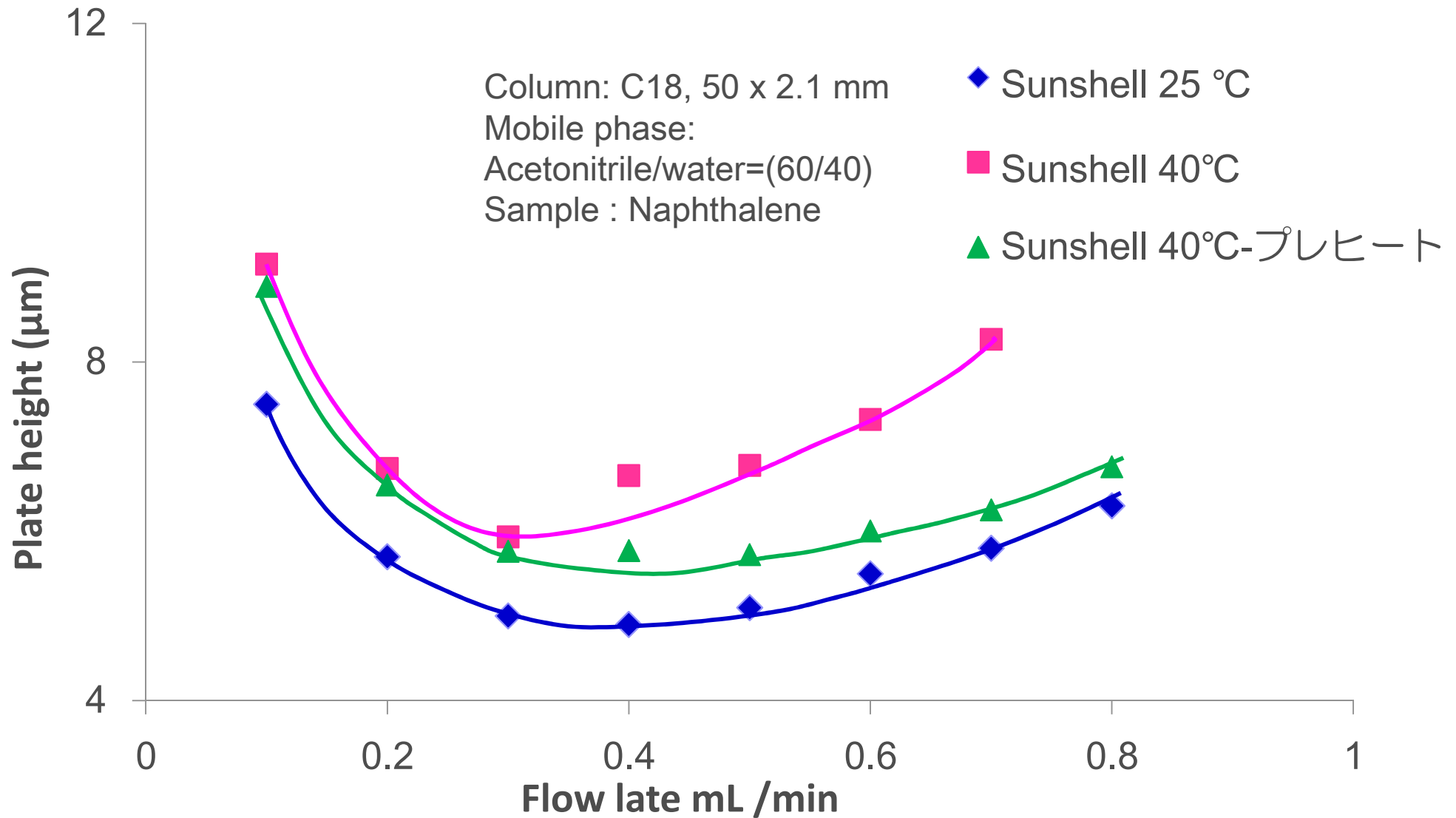
HPLC使用



5μm 4.6x250mm (20,000段) と同じ段数

SunSell C18 100x4.6mm
分析時間40%
使用溶媒量40%

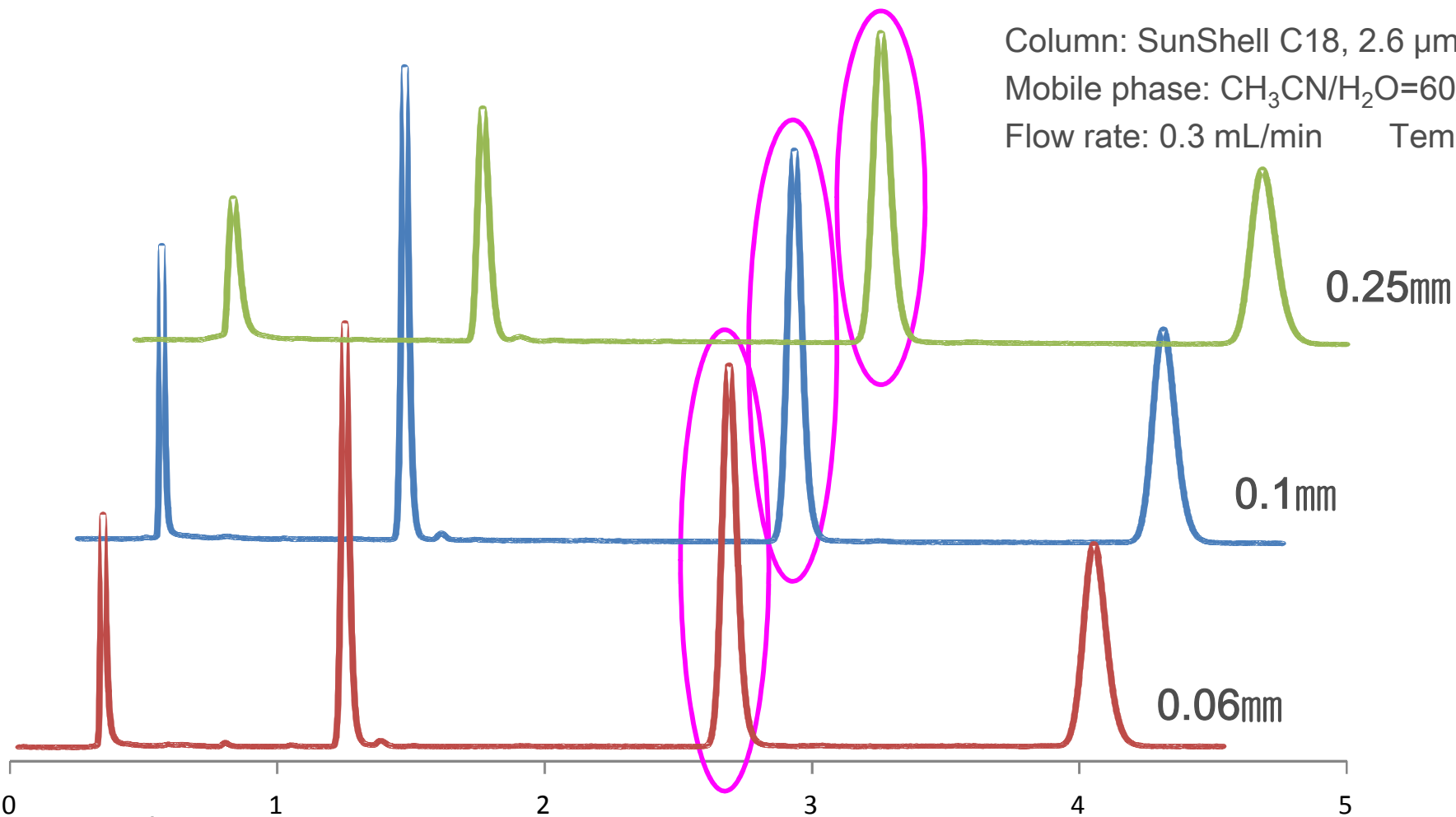
温度の影響



Sunshell: Coreshell type column
 Sunniest: Fully porous type column

カラムー検出器間における配管の影響

Column: SunShell C18, 2.6 μ m 50 x 2.1 mm
 Mobile phase: CH₃CN/H₂O=60/40
 Flow rate: 0.3 mL/min Temperature: 25 °C

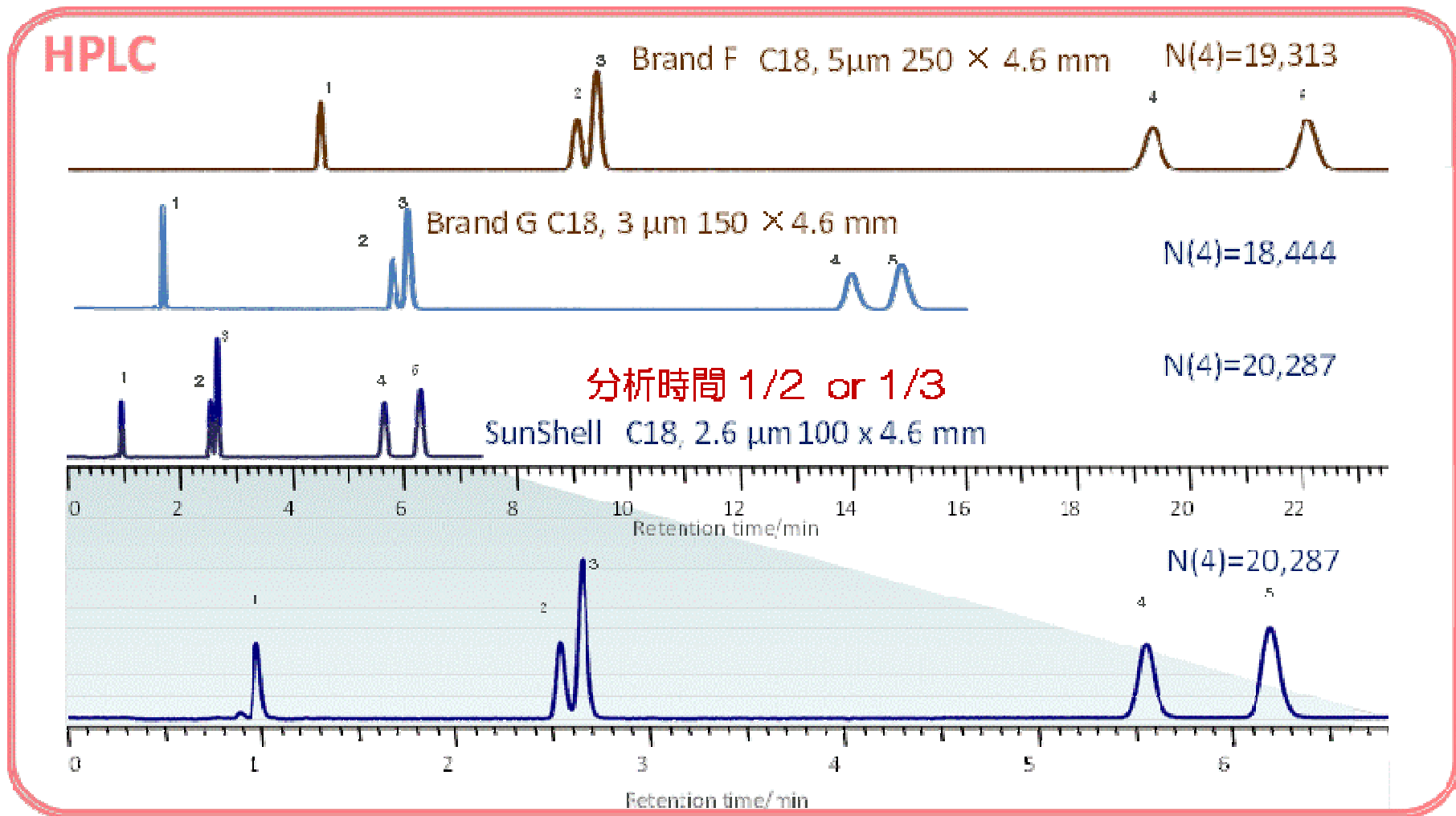


三番目ピークの理論段数の平均値 (n=3)

	0.06mm	0.1mm	0.25mm
理論段数	10704	10345	7998

イソクラティック溶離例

5 μ m, 3 μ m C18からの移行



Mobile phase: CH₃CN/20mM Phosphoric acid = 45/55

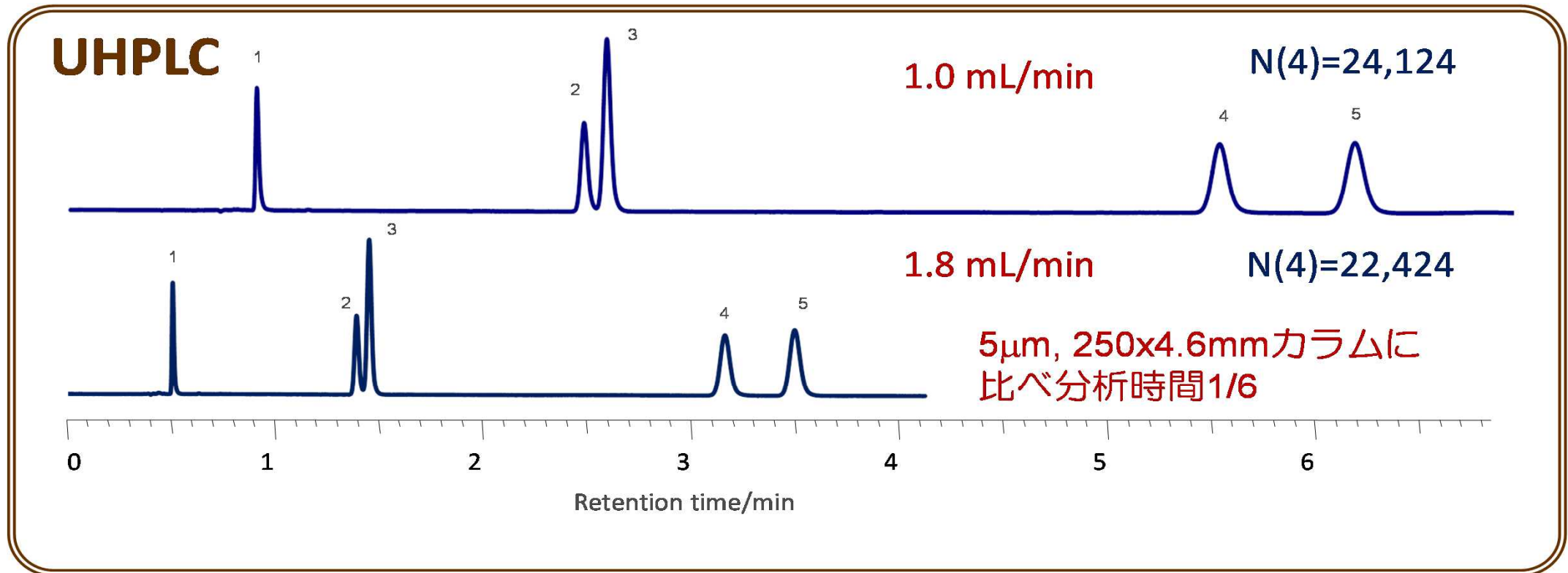
Flow rate: 1.0 mL/min, Temperature: 25 °C, Detection: UV230 nm

Pressure: 9.5 MPa for Brand F C18 5 mm, 13.4 MPa for SunShell C18 2.6 mm

Sample: 1 = Benzydamine, 2 = Ketoprofen, 3 = Naproxen, 4 = Indomethacin, 5 = Ibuprofen

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE (内径0.25mmの配管仕様)

イソクラティック溶離例 UHPLC



Column: SunShell C18, 2.6 mm 100 x 4.6 mm

Mobile phase: CH₃CN/20mM Phosphoric acid = 45/55

Flow rate: 1.0 mL/min, 1.8 mL/min

Temperature: 25 °C

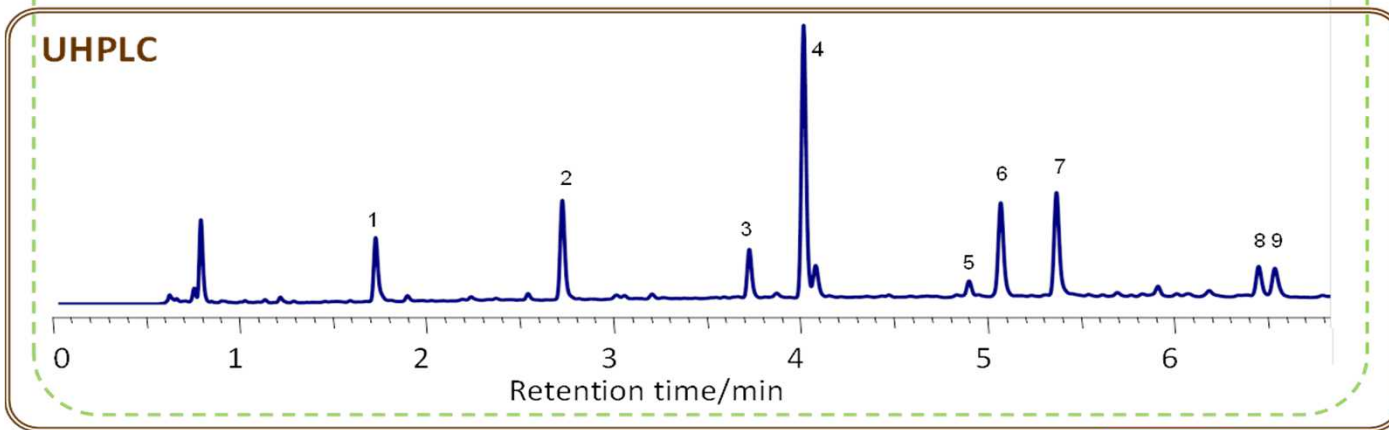
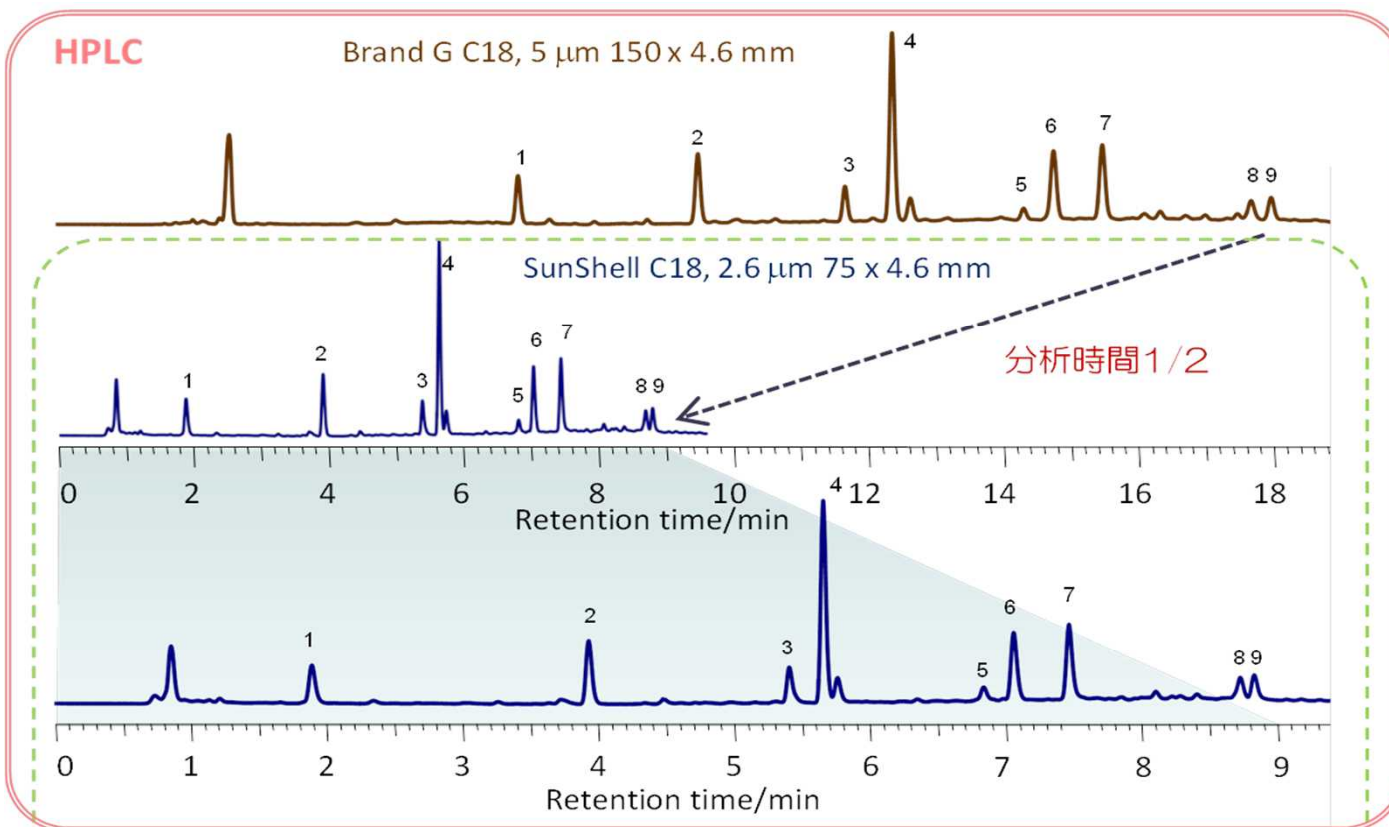
Pressure 13.4 MPa Detection: UV230 nm

Sample: 1 = Benzydamine, 2 = Ketoprofen, 3 = Naproxen, 4 = Indomethacin, 5 = Ibuprofen

UHPLC: Jasco X-LC

グラジエント溶離例

5 μ m C18からの移行



Column:

Brand G C18, 5 μ m 150 x 4.6 mm

SunShell C18, 2.6 μ m 75 x 4.6 mm

Mobile phase:

A) 0.1% Phosphoric acid

B) CH₃CN

Gradient program for Brand G C18

Time	0 min	15 min	20 min
%B	2%	25%	25%

for SunShell C18

Time	0 min	7.5 min	10 min
%B	2%	25%	25%

Flow rate: 1.0 mL/min,

Temperature: 25 °C

Detection: UV@250 nm

Sample: Oolong tea

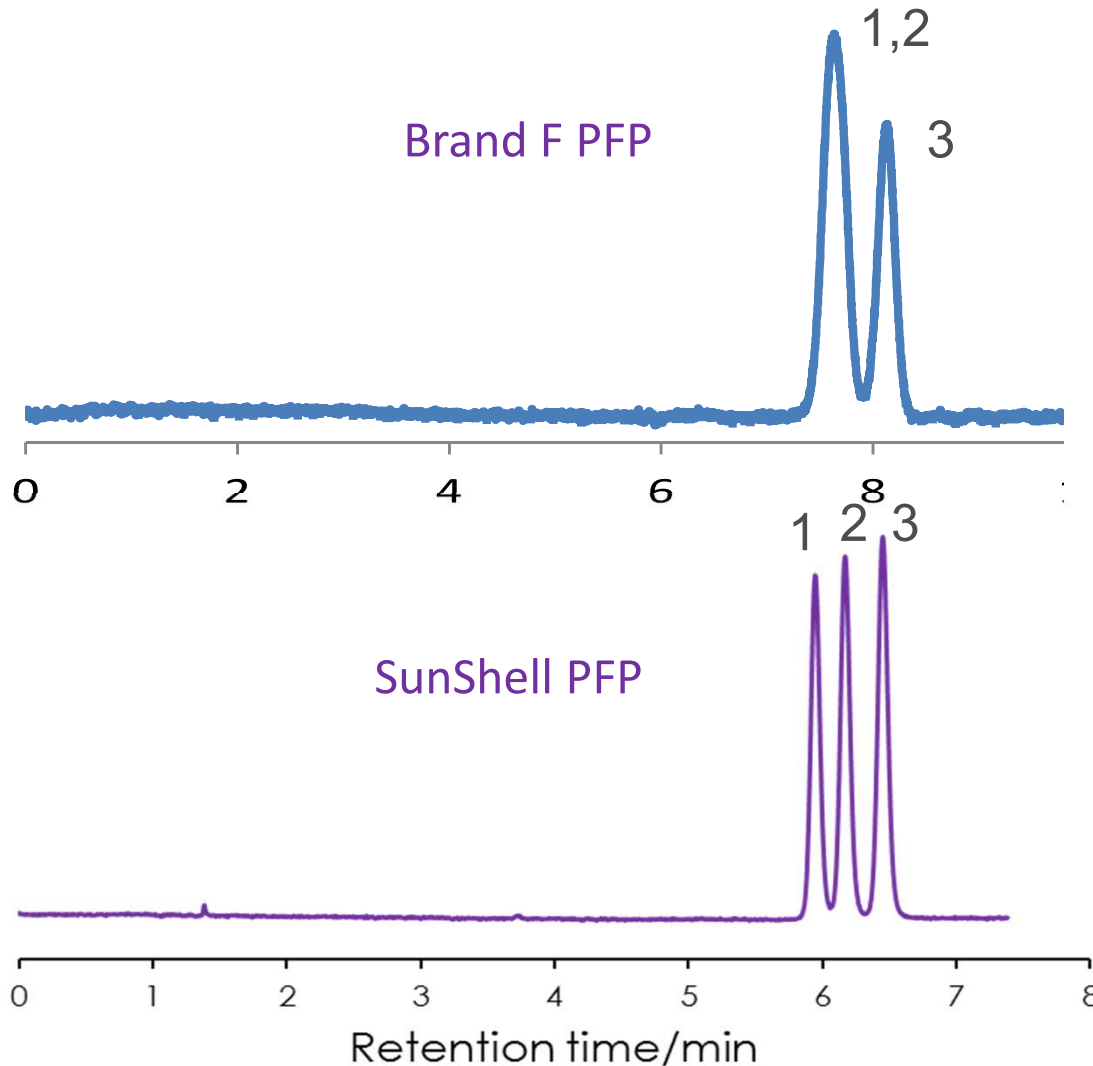
- 1 = Gallic acid
- 2 = Epigallocatechin
- 3 = Catechin
- 4 = Caffeine
- 5 = Epicatechin
- 6 = Epigallocatechin gallate
- 7 = Gallic acid
- 8 = Epicatechin gallate
- 9 = Catechin gallate

HPLC: Hitachi LaChrom ELITE

(内径0.25mmの配管仕様)

UHPLC: Jasco X-LC

クレゾールの異性体の分離



Column:

Brand F PFP, 5 μm 150 x 4.6 mm

SunShell PFP, 2.7 μm 150 x 4.6 mm

Mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}=40/60$

Flow rate: 1.0 mL/min

Temperature: 25 $^\circ\text{C}$

Sample:

1 = p-Cresol

2 = m-Cresol

3 = o-Cresol

全多孔性5 μm PFPカラムでは、p-クレゾールとm-クレゾールは分離不可能ですが、コアシェル型のSunshell PFPでは分離が可能です。

まとめ

- コアシェル型カラムの理論段数をHPLCとUHPLCで比較した結果、UHPLCでは25%程度高い性能を示した
- 内径0.1 mmの配管を用いると0.25 mmの配管とに比べ、20%程度理論段数の改善が観察された
- コアシェル型カラムでは、粒子径5 μm , 3 μm のカラムに比べ、短いカラムで同等の分離が達成され、分析時間・使用溶媒量が大幅に削減できる
- コアシェル型カラムをHPLCに用いることは、分析の高速化、高感度化に有用であることが示唆された